

# 粉纹夜蛾类 Cry1Ac 受体氨肽酶 N cDNA 片段的克隆与分析

蒋才富, 刘凯于, 彭 蓉, 彭建新, 洪华珠\*

(华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430079)

**摘要:** 设计简并引物, 采用 RT-PCR 方法对粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Hübner) 细胞系 BTI-TN-5B1-4 的氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN) 基因 cDNA 片段进行了克隆和序列分析, 通过两对引物扩增出了两种氨肽酶 N 基因的 cDNA 片段, 大小分别为 188 bp 和 564 bp, 分别命名为 AS188 (GenBank 登录号: CD809324) 和 AS564 (GenBank 登录号: CD809326)。对这两个片段推导的氨基酸序列进行同源性分析, 结果表明两者与已报道的鳞翅目昆虫中肠的 Cry1Ac 毒素受体氨肽酶 N 有较高的同源性。

**关键词:** 粉纹夜蛾; 离体细胞; 氨肽酶 N; 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)03-0412-05

## Cloning and analysis of two Cry1Ac receptor-like aminopeptidase N cDNA fragments from *Trichoplusia ni* (Hübner) cultured cell

JIANG Cai-Fu, LIU Kai-Yu, PENG Rong, PENG Jian-Xin, HONG Hua-Zhu\* (Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

**Abstract:** Some aminopeptidase N (APNs) serve as *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac toxin receptor in the midguts of several lepidopteran insects. Two fragments of two different APN genes in BTI-TN-5B1-4 (a cloned cell line from *Trichoplusia ni* ovary) were amplified with two pairs of degenerate primers by RT-PCR, and the lengths of them were 188 bp and 564 bp, and named AS188 (GenBank Accession: CD809324) and AS564 (GenBank Accession: CD809326) respectively. Deduced protein sequences were highly similar to that of several receptor APNs in insects, with sequence identities of 45%–47% for the shorter one and 61%–63% for the other.

**Key words:** *Trichoplusia ni*; cultured cell; aminopeptidase N; gene; clone; sequence analysis

随着转 Bt 基因植物以及 Bt 生物农药的推广, 许多有害昆虫对 Bt 类制剂产生了不同程度的抗性 (梁革梅等, 2000)。研究表明, 昆虫抗性的产生主要与毒素受体位点密度或结构的改变等有关 (谭声江等, 2002)。Bt Cry1Ac 毒素在许多鳞翅目昆虫中肠中的主要受体是氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN) 和钙粘蛋白。

粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Hübner) 是一种危害严重的农作物和花卉害虫, 有研究报道该虫的中肠刷状缘膜囊 (BBMV) 上的氨肽酶 N 是 Bt Cry1Ac 毒素的主要受体 (Lorence *et al.*, 1997), 该虫能对 Bt Cry1A 类毒素产生高水平的抗性 (Estada and Ferre, 1994)。由于离体培养细胞比虫体易于开展分子生物学研究, 我们以筛选的抗性指数为 1 280 倍的粉纹夜蛾

细胞系 BTI-TN-5B1-4 为材料, 以揭示昆虫细胞对 Bt Cry1Ac 毒素的抗性机制。Bt Cry1Ac 毒素配体结合免疫印迹实验结果表明, 在 BTI-TN-5B1-4 细胞中存在 158.5 和 118.8 kD 两种毒素受体蛋白, 它们与已报道的 Cry1Ac 毒素受体氨肽酶 N 的分子量十分相近 (刘凯于等, 2003), 在这种细胞中也检测到了氨肽酶的活性 (张黎霞等, 2002), 因此推测氨肽酶 N 极有可能分布于该细胞, 并且是该细胞中 Cry1Ac 毒素的主要受体之一。我们利用 RT-PCR 方法, 扩增了对 Cry1Ac 毒素非常敏感的 BTI-TN-5B1-4 细胞中的两个类 Cry1Ac 毒素受体氨肽酶 N 基因的 cDNA 片段, 并进行了序列分析, 为深入研究氨肽酶 N 的变化与粉纹夜蛾 BTI-TN-5B1-4 细胞对 Bt Cry1Ac 毒素的抗性的关系及害虫治理提供基础。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39070014)

作者简介: 蒋才富, 男, 1979 年生, 四川眉山人, 硕士研究生, E-mail: jcaifuren@etang.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: hzhong@ccnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2003-06-12; 接受日期 Accepted: 2003-11-03

1 材料和方法

1.1 供试细胞

粉纹夜蛾细胞系 BTI-TN-5B1-4 由美国康奈尔大学 Granados 教授馈赠,它对活性 Bt Cry1Ac 毒素很敏感,用添加了 5% 的胎牛血清的 TNM-FH 培养基在 28℃ 恒温下培养。

1.2 主要试剂

总 RNA 纯化试剂盒(Total RNA Purification Kit), DNA 胶回收试剂盒(DNA Gel Extraction Kit)为维特洁生化公司产品; Taq 酶为 Biostar 公司产品; M-MLV 反转录酶, dNTP, pGEM-T 载体为 Promega 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取: 按照总 RNA 纯化试剂盒说明进行。

1.3.2 单链 cDNA 合成: 参照 Sambrook 等(1996)的方法进行。

1.3.3 引物序列: 根据 Bt Cry1Ac 毒素受体氨肽酶 N 高度保守区氨基酸的序列设计简并引物对 I 和引物对 II。

引物对 I:

P1: 5'-GGNGCNATGGARAAYTGGGG-3';

P2: 5'-GCRAANCCYTCRTTNARCCA-3'。

引物对 II:

P3: 5'-TTYCCNIGYTAYGAYGARCC-3';

P4: 5'-CCAAACCACWKGTGWGCCAG-3'。

1.3.4 PCR 扩增 cDNA 片段: PCR 扩增总体积为 75  $\mu$ L, 反应缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 50

mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, dNTPs 终浓度为 0.15 mmol/L, 含模板 2 ng, Taq 酶 2 U, 2  $\mu$ mol/L 上游引物和下游引物。

引物对 I 的扩增条件: 94℃ 预变性 3.5 min, 94℃ 35 s, 59℃ 35 s, 72℃ 30 s, 循环 30 次, 然后 72℃ 延伸 10 min。引物对 II 的反应条件除退火温度为 56℃ 外其他条件与引物对 I 的扩增条件一致。

1.3.5 PCR 产物克隆与测序: PCR 产物纯化按照 DNA 胶回收试剂盒说明进行, 纯化后的片段克隆于 pGEM-T 载体上, 由博亚生物公司测序。

1.3.6 序列分析: 用 ExPASy 进行翻译, 用 Blast 软件作同源性比较分析。

2 结果与分析

2.1 BTI-TN-5B1-4 细胞氨肽酶 N cDNA 片段序列及推导的氨基酸序列

用引物对 I 进行 RT-PCR, 扩增出了与预期大小相符的 188 bp 的 cDNA 片段(图 1), 大小不相符的另一片段为非特异扩增。将得到的靶片段克隆到 pGEM-T 中, 随机挑选 8 个阳性克隆子进行测序, 得到了 2 种不同的核苷酸序列, 两者的长度都为 188 bp, 推导出的氨基酸残基数均为 62 个(图 3)。在此基础上, 再根据 Cry1Ac 毒素受体氨肽酶 N 基因编码区的另两个高度保守区设计了另一对简并引物(引物对 II), 其下游引物是根据测知序列设计的特异引物, 上游引物为简并引物。用引物对 II 进行 RT-PCR, 得到了与预期大小相符的 510 bp 的 cDNA 片段

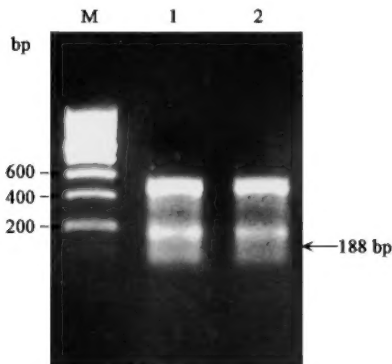


图 1 粉纹夜蛾氨肽酶 N 基因 188 bp cDNA 片段的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of 188 bp fragment of APN gene cDNA in BTI-TN-5B1-4

M: 标准分子量 Molecular weight marker; 1, 2: 利用引物对 I 的 PCR 扩增产物 Products of PCR amplification with primers P1 and P2.

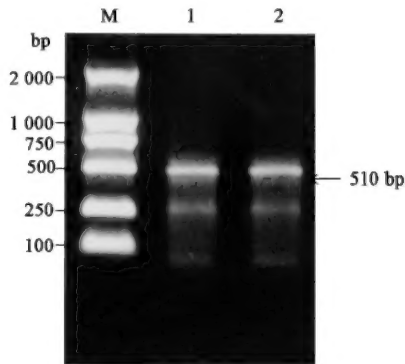


图 2 粉纹夜蛾氨肽酶 N 基因 510 bp cDNA 片段的 PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of 510 bp fragment of APN gene cDNA in BTI-TN-5B1-4

M: 标准分子量 Molecular weight marker; 1, 2: 利用引物对 II 的 PCR 扩增产物 Products of PCR amplification with primers P3 and P4.

(图 2), 克隆后同样随机挑选了 8 个阳性克隆进行测序, 所测 8 个克隆子序列相同, 根据这一序列推导出了 169 个氨基酸残基序列(图 4)。将 188 bp cDNA 序列和 510 bp cDNA 序列进行分析发现所得的 510bp cDNA 序列与一种 188 bp cDNA 序列来自同一种氨肽酶 N 基因, 将二者进行拼接, 得到了一个 564 bp 的序列, 根据此序列推导出的氨基酸残基数为 187 个(图 4)。本实验通过以上两次 RT-PCR 反应, 获得了一个 188 bp 的氨肽酶 N cDNA 片段序列 (AS188, GenBank 登录号: CD809324) 和一个 564 bp 的氨肽酶 N cDNA 片段 序列 (AS564, GenBank 登录

号: CD809326), 分别推导出了一个 62 个和一个 187 个氨基酸的序列。

2.2 同源性比较

将推导的两个氨基酸序列与已报道的 5 种鳞翅目昆虫中肠上 Bt Cry1Ac 毒素受体氨肽酶 N 进行同源性分析, 结果如图 5、图 6 所示, 两个推导的氨基酸序列与它们同源性都较高, 如表 1 所示。因此本实验所得到的 188 和 564 bp 核苷酸序列很可能为编码粉纹夜蛾细胞系 TN-5B1-4 中 Bt Cry1Ac 毒素受体 APN 的部分氨基酸序列。

```
1  ggtgcgatggagaaattggggtctgattacatacaggagacttcattccttgttgatgag 60
      P1
      G A M E N W G L I T Y R E T S F L V D E
61  gctaaagcatcagccatgaacaagatcaatgttgcgaataccatcactcatgagctggca 120
      A K A S A M N K I N V A N T I T H E L A
121 cacatgtggtttgtaatttggttactatgaagtgggtggatgaagtcaggctaaacag 180
      P2
      H M W F G N L V T M K W W D E V W L N E
181 ggcttcgc 188
      G F
```

图 3 BTI-TN-5B1-4 细胞的一种氨肽酶 N 基因 cDNA 片段 AS188 序列及推导的氨基酸序列  
Fig. 3 The APN cDNA fragment AS188 and deduced amino acid sequence cloned from the BTI-TN-5B1-4 cell  
加下划线的为引物序列 The underlined sequence represents primers.

```
1  tttcccggtttacgatgagcctgcaatcaaagccactttcgatattactctggagggtgcc 61
      P3
      F P C Y D E P A I K A T F D I T L E V P
62  ctggatcgtgttagccctatctaataatgcctgttaaggaggagaaaaacaatggcgaaag 121
      L D R V A L S N M P V K E E K T N G G K
122 aaaatagtacattatgatacaactcctataatgtctacatatcttgtggcattttagtt 181
      K I V H Y D T T P I M S T Y L V A F V V
182 ggagaatatgacttttgggagaaaaagtctcgtgatggtgtattagtaagagtttacact 241
      G E Y D F V E K K S R D G V L V R V Y T
242 ccagtgggttaaagtaaacagggaatgttgccttagaagtgagcagctcgagtgctccc 301
      P V G K S K Q G M F A L E V A A R V L P
302 tattacaaggaatattttgatatagcttatcccctgccaaagattgatttgatagcaata 361
      Y Y K E Y F D I A Y P L P K I D L I A I
362 gctgatttctcgtctggtgccatggagaactggggccttgtcacttatagagagacttgc 421
      P4
      A D F S A G A M E N W G L V T Y R E T C
422 ctgctagtagatgaagaacacacatcagctgtgaggaggcagtgagtagctctgttggtt 481
      L L V D E E H T S A V R R Q W I A L V V
482 ggatcatgaactggctcaccagtggtttggaaaccttgtcactatggagtggttgactcat 541
      P1
      G H E L A H Q W F G N L V T M E W W T H
542 ctttggttcaatgaaggtttcgc 564
      P2
      L W F N E G F
```

图 4 BTI-TN-5B1-4 细胞的一种氨肽酶 N 基因 cDNA 片段 AS564 序列及推导的氨基酸序列  
Fig. 4 The APN cDNA fragment AS564 and deduced amino acid sequence cloned from the BTI-TN-5B1-4 cell  
加下划线的为引物序列 The underlined sequence represents primers.

AS188  
*Heliothis virescens*  
*Bombyx mori*  
*Helicoverpa armigera*  
*Lymantria dispar*  
*Manduca sexta*

GAMENWGL I TYRETSFLVDEAKASAMNK INVANT I THELAHMFVGNLVTMKWWDVWLNEG  
GAMENWGLL TYREAL I LYDPLNSNHHRQVRAN IVSHE I AHMWFVGNLVTCAWWDNLWLNEG  
GAMENWGLL TYREAL I LYDPLNSNHFYKQVRAN IVAHE I AHMWFVGNLVTCAWWDNLWLNEG  
GAMENWGLL TYREAL I LFDPVNTNFFYRQR I AN I SHE I AHMWFVGNLVTCAWWDNLWLNEG  
GAMENWGLL TYREALMLYDPLNSNHFYRQRAN I SHE I THMWFVGNLVTCAWWDNLWLNEG  
GAMENWGLL TYREAYLLYDEQHTNSYFKQ I IAYLSHE I AHMWFVGNLVTNAWWDVLWLNEG  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*: \* \* : \* :\*:\*\*\*\*\* \*\*

图5 根据 AS188 推导的氨基酸序列与 5 种昆虫的 Bt Cry1Ac 毒素受体氨肽酶 N 的同源性比较  
Fig. 5 Homologous analysis of deduced amino acid sequence from AS188 and corresponding sequences of APNs served as Bt Cry1Ac toxin receptors from five moth species

\* "代表与推导的氨肽酶 N 一致的氨基酸, "."和":"代表与粉纹夜蛾氨肽酶 N 相似的氨基酸。下同。  
\* "indicate amino acid identical to that from BTI-TN-5B1-4, "."and ":"indicate amino acid positive to that from BTI-TN-5B1-4. The same below.

AS564  
*Heliothis virescens*  
*Bombyx mori*  
*Helicoverpa armigera*  
*Lymantria dispar*  
*Manduca sexta*

AS564  
*Heliothis virescens*  
*Bombyx mori*  
*Helicoverpa armigera*  
*Lymantria dispar*  
*Manduca sexta*

AS564  
*Heliothis virescens*  
*Bombyx mori*  
*Helicoverpa armigera*  
*Lymantria dispar*  
*Manduca sexta*

图 6 根据 AS564 推导的氨基酸序列与 5 种昆虫的 Bt Cry1Ac 毒素受体氨肽酶 N 的同源性比较  
Fig. 6 Homologous analysis of deduced amino acid sequence from AS564 and corresponding sequences of APNs served as Bt Cry1Ac toxin receptors from five moth species

表1 克隆的氨肽酶N的cDNA片段推导的氨基酸序列与5种昆虫中肠的Cry1Ac毒素受体同源性及相似性比较

**Table 1 Homologous analysis of deduced amino acid sequences from cloned APN cDNA fragments in BTI-TN-5B1-4 and the APNs served as Cry1Ac toxin receptors in the midguts of five moth species**

	同一性 Identities (%)				
	烟芽夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	舞毒蛾 <i>Lymantria dispar</i>	烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>
AS188	61	63	61	61	61
AS564	47	45	48	46	46

### 3 讨论

目前国外已从烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、家蚕 *Bombyx mori*、美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea*、舞毒蛾 *Lymantria dispar* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 等多种昆虫中克隆出了 Bt Cry1Ac 毒素受体氨肽酶 N 基因, 国内中国农业科学院植物保护研究所和中国科学院动物研究所也有关于克隆中国棉铃虫氨肽酶 N 基因的报道 (Knight *et al.*, 1995; Hua *et al.*, 1998; Oltean *et al.*, 1999)。但是尚未见粉纹夜蛾氨肽酶 N 基因或其基因片段克隆的报道, 也未见从任何昆虫细胞系中克隆氨肽酶 N 基因或其基因片段的报道, 此研

究结果填补了这方面的欠缺。

Bt Cry1Ac 毒素对昆虫的毒力与毒素受体氨肽酶 N 相关,这已为众多研究者所证实。Zhu 和 Wu (网页内容)还分别报道了印度谷螟和中国棉铃虫抗性昆虫的类氨肽酶 N 基因与敏感昆虫的比较有错义点突变发生,该突变可能与抗性产生有关(Zhu *et al.*, 2000)。从印度谷螟克隆的类氨肽酶 N 基因推导的氨基酸序列与已经报道的小菜蛾、烟草天蛾和家蚕的 Bt CryAc 毒素受体氨肽酶 N 氨基酸序列同一性为 51% ~ 52%,而我们克隆的 AS188 和 AS564 两个氨肽酶 N 的 cDNA 片段推导出的氨基酸序列与 5 种鳞翅目昆虫的氨肽酶 N 的同一性分别为 45% ~ 48% 和 61% ~ 63%,相似性分别为 73% ~ 75% 和 82% ~ 84%。同源性和相似性分析结果表明,我们得到的氨肽酶 N 基因 cDNA 片段极有可能就是粉纹夜蛾细胞中 Bt Cry1Ac 毒素受体类氨肽酶 N 基因的部分序列。在这一实验结果的基础上,我们今后将采用 RACE 方法克隆这两个氨肽酶 N 基因的全长序列,比较敏感细胞和来源于同一克隆细胞系的抗性细胞这两个氨肽酶 N 基因的差异,采用反义 RNA 技术和基因定点突变法研究氨肽酶 N 位点密度或结构的改变与抗性的相关性,深入探讨粉纹夜蛾抗 Bt 的机制。

## 参考文献 (References)

- Estada U, Ferre J, 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (10): 3 840 - 3 846.
- Hua G, Tsukamoto K, Rasilo ML, Ikezawa H, 1998. Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin. *Gene*, 214: 177 - 185.
- Knight PJK, Knowles BH, Ellar DJ, 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *J. Biol. Chem.*, 270: 17 765 - 17 770.

- Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 2000. Studies on the resistance screening and cross-resistance of cotton bollworm to *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *Scientia Agricultura Sinica*, 33(4): 46 - 53. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 2000. 棉铃虫对 Bt 的抗性筛选及交互抗性研究. 中国农业科学, 33 (4): 46 - 53]
- Liu KY, Jiang CF, Hong HZ, Peng JX, Yu ZH, 2003. Comparison of studies on CryIA-binding in resistant and susceptible cells in *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1. *Entomological Knowledge*, 40 (3): 247 - 250. [刘凯于, 蒋才富, 洪华珠, 彭建新, 余泽华, 2003. 粉纹夜蛾细胞中 Bt Cry1Ac 选择抗性的研究及离体品系与毒素结合的比较. 昆虫知识, 40 (3): 247 - 250]
- Lorence A, Darszon A, Bravo A, 1997. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Lett.*, 414(2): 303 - 307.
- Oltean DI, Pullikuth AK, Lee HK, Gill SS, 1999. Partial purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin receptor A from *Heliothis virescens* and cloning of the corresponding cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (11): 4 760 - 4 766.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Translated by Jin DY, Li MF, Hou YD), 1996. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Beijing: Science Press. 880 - 885. [Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (金冬雁, 黎孟枫, 侯云德译), 1996. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社. 880 - 885]
- Tan SJ, Chen XF, Li DM, 2002. Progress in the studies on *Helicoverpa* spp. resistance to transgenic Bt cotton and its management strategy. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 138 - 144. [谭声江, 陈晓峰, 李典谟, 2002. 棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性及其治理策略研究进展. 昆虫学报, 45 (1): 138 - 144]
- Zhang LX, Luo YF, Liu KY, Zhong CY, Chen XJ, Hong HZ, 2002. Comparison of esterase and aminopeptidase activities from resistant and susceptible BTI-TN-5B1 cell. *Journal of Central China Normal University (Nat. Sci.)*, (Monograph): 95 - 98. [张黎霞, 罗云峰, 刘凯于, 钟春英, 陈小军, 洪华珠, 2002. 抗 Bt Cry1Ac 毒素粉纹夜蛾离体细胞脂酶和氨肽酶活力变化的研究. 华中师范大学学报(自然科学版), 专辑: 95 - 98]
- Zhu YC, Kramer KJ, Oppert B, Dowdy AK, 2000. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(3): 215 - 224.

(责任编辑: 黄玲巧)